

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
A 6 1 K 35/48	A A B	A 6 1 K 35/48	A A B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)

(21)出願番号	特願平8-527777	(71)出願人	ユニヴァーシティ オブ サウス フロリ ダ アメリカ合衆国 フロリダ州 33620- 7900 タンパ イースト ファウラー ア ベニュー 4202 エフエイオー 126
(86) (22)出願日	平成8年(1996) 3月12日	(72)発明者	サンバーグ ボール アール アメリカ合衆国 フロリダ州 34610 ス プリング ヒル パイロット カントリー ドライブ 11751
(85)翻訳文提出日	平成9年(1997) 9月16日	(74)代理人	弁理士 中村 稔 (外7名)
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 6 / 0 3 3 3 5		
(87)国際公開番号	W O 9 6 / 2 8 0 3 0		
(87)国際公開日	平成8年(1996) 9月19日		
(31)優先権主張番号	0 8 / 4 0 2 , 3 8 9		
(32)優先日	1995年 3月13日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経変性疾患用の神経回復誘発細胞としてのセルトーリ細胞

(57)【要約】
セルトーリ細胞（その細胞はin situ で栄養因子を生じ
る）を哺乳類の栄養因子を要する組織に移植すること
によりin situ 栄養因子産生を生じる方法。

【特許請求の範囲】

1. セルトーリ細胞（その細胞はin situ で栄養因子を生じる）を哺乳類の栄養因子を要する組織に移植することによる栄養因子のin situ 生成方法。
2. 栄養因子を要する組織が哺乳類の中樞神経系である請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 哺乳類が神経変性疾患を含む神経疾患を患い、前記方法が更に分泌栄養因子の作用により疾患により生じた挙動上及び機能上の欠損を回復する工程を含む請求の範囲第2項に記載の方法。
4. セルトーリ細胞がブタセルトーリ細胞である請求の範囲第1項に記載の方法。
5. 前記移植工程が変性疾患から中樞神経系を保護するものとして更に特定される請求の範囲第2項に記載の方法。
6. 前記移植工程が損傷された中樞神経系組織を回復するものとして更に特定される請求の範囲第2項に記載の方法。
7. 神経疾患又は神経変性疾患が癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の情動障害を含む請求の範囲第3項に記載の方法。
8. 癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の情動障害を含む神経疾患を治療するためにブタセルトーリ細胞（その細胞はin situ で栄養因子を分泌する）を被験者の中樞神経系に移植することによるin situ 栄養因子産生を生じる方法。
9. 被験者がヒトである請求の範囲第8項に記載の方法。
10. セルトーリ細胞（そのセルトーリ細胞はin situ で栄養因子を分泌する）を被験者の組織損傷の領域に移植することによるin situ 栄養因子産生を生じる方法。
11. セルトーリ細胞（その細胞はin situ で栄養因子を生じる）を哺乳類の栄養因子を要する組織に移植することにより栄養因子をin situ で生じるためのセ

ルトーリ細胞の使用。

12. 栄養因子を要する組織が哺乳類の中樞神経系である請求の範囲第1項に記載の使用。

13. 哺乳類が神経変性疾患を含む神経疾患を患い、前記使用が分泌栄養因子の作用により疾患により生じた挙動上及び機能上の欠損を回復する請求の範囲第2項に記載の使用。

14. セルトーリ細胞がブタセルトーリ細胞である請求の範囲第1項に記載の使用。

15. 前記移植が変性疾患から中枢神経系を保護するものとして更に特定される請求の範囲第2項に記載の使用。

16. 前記移植が損傷された中枢神経系組織を回復するものとして更に特定される請求の範囲第2項に記載の使用。

17. 神経疾患又は神経変性疾患が癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の情動障害を含む請求の範囲第3項に記載の使用。

18. 癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の情動障害を含む神経疾患を治療するために、ブタセルトーリ細胞（その細胞はin situ で栄養因子を分泌する）を被験者の中枢神経系に移植することによりin situ 栄養因子産生を生じるのに有益であるセルトーリ細胞。

19. 被験者がヒトである請求の範囲第18項に記載のin situ 栄養因子産生を生じるのに有益であるセルトーリ細胞。

20. セルトーリ細胞（そのセルトーリ細胞はin situ で栄養因子を分泌する）を被験者の組織損傷の領域に移植することによりin situ 栄養因子産生を生じるのに有益であるセルトーリ細胞。

【発明の詳細な説明】神経変性疾患用の神経回復誘発細胞としてのセルトーリ細胞

技術分野

本発明は一般に細胞移植、詳しくは、中枢神経系(CNS)への移植後に、神経疾患及び神経変性疾患と関連する挙動上及び機能上の欠損を回復する細胞の移植方法に関する。

発明の背景

疾患を治療する際に、組織を栄養因子で全身ではなく局所で、例えば、創傷治療の場合のように組織損傷の領域で治療することがしばしば有益である。

更に別の例として、哺乳類中枢神経系(CNS)への神経組織の移植は、癲癇、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病、及び脳の情動障害を含む神経疾患及び神経変性疾患の別の治療になりつつある。前臨床データ及び臨床データは、神経変性疾患のこれらの型に関する細胞移植プロトコルに使用される移植細胞(移植片)が生存し、宿主組織と合体し、機能回復を与えることを示す(Sanbergら, 1994)。

これらの移植片の主要源は胎児であった。例えば、胎児の腹側中脳組織はパーキンソン病における生存可能な移植片源であることが実証されていた(Lindvallら, 1990; Bjorklund, 1992)。同様に、胎児の線条体組織がハンチントン病における移植片物質として成功裏に利用されていた(Isacsonら, 1986; Sanbergら, 1994)。

神経機能障害の動物は非胎児細胞及び非神経細胞/組織を移植されていた。例えば、成体ドナーからのクロム親和細胞がパーキンソン病の治療に使用されていた。移植プロトコルのこの型の主要な利点は、移植片源が胎児源ではなく、それにより、胎児組織を獲得することに関連する倫理的かつ論理的問題を回避することである。クロム親和細胞プロトコルを利用して、挙動の正常化が観察される。しかしながら、この挙動の機能回復は一時的であり、しかも動物がそれらの前移

植状態にもどる(Bjorklund及びStenevi, 1985; Lindvallら, 1987)。治療プロ

トコルのこの型がパーキンソン病モデルで動物の正常な挙動活動を維持できないことは、このプロトコルだけでなく、その他の治療法の臨床上の適用を時期尚早にする。

神経疾患及び神経変性疾患を治療する手段としての成長因子の投与が当業界で意図されていた。しかしながら、これらの薬剤を脳に送出することは、未だに成功裏に解消されるべき多くの難点を伴う。一般に、これらの薬剤は全身投与できず、しかも脳への注入は非実用的かつ不完全な解決である。脳に移植される時に特定の単一栄養因子を送出するように細胞を操作することが示唆されていたが、脳に移植された時の細胞の安定なトランスフェクション及び生存が絶えず問題である。更に、協力して作用する多種栄養因子はおそらく神経症状及び神経変性症状の成功裏の治療に必要であることが次第に認められるようになりつつある。

機能回復の長期維持が、単離された臍島細胞及びセルトーリ細胞を使用する新規な移植治療プロトコルを使用して糖尿病動物モデルで観察されていた。その治療の効力は、セルトーリ細胞の存在のため、一部、それらの知られている免疫抑制分泌因子のためであることが明らかである (Selawry 及び Cameron, 1993; Cameron ら, 1990)。セルトーリ細胞は又幾つかの重要な栄養成長因子を分泌することが知られている。

それ故、損傷された組織の成長因子及び栄養因子支持が有益である疾患に関する源としてセルトーリ細胞単独を使用することが望ましいであろう。例として、創傷治癒及び神経変性疾患を含む神経疾患が挙げられる。セルトーリ細胞は栄養因子の *in situ* ファクトリーとして機能し、それにより創傷治癒を早め、かつ神経疾患及び神経変性疾患と関連する機能上及び挙動上の欠損を回復するのに使用し得る。

発明の要約

本発明によれば、セルトーリ細胞（その細胞は栄養因子を *in situ* で分泌する）を哺乳類に移植することによる *in situ* 栄養因子産生を生じる方法が提供される。

図面の簡単な説明

本発明のその他の利点は、添付図面に関して考慮される場合の下記の詳細な説明を参考にすることにより容易に理解されると同時に、良く理解されるようになる。

図1はアポモルヒネ誘発回転挙動の結果を示すグラフであり、両グループからの動物がアポモルヒネ前移植で攻撃誘発された時に1分間当たり >7 回転、又は30分間にわたって少なくとも合計210の回転を示し（病変に対し反対側）、後移植期間に、培地単独を受けている動物は有意な回転を示し続け、対照的に、セルトリー細胞を受けている動物は後移植期間にわたってそれらの回転挙動の著しい減少（60%より大きい）を有していた。

図2はバイアスされた揺動挙動を示すグラフであり、両グループからの動物が上昇された生体揺動試験により明らかなように $>80\%$ のバイアスされた揺動活動（病変に対し反対側）を示し、後移植期間に、培地単独を受けている動物は有意なバイアスされた揺動活動を示し続け、対照的に、セルトリー細胞を受けている動物は後移植期間にわたってバイアスされた揺動挙動を示さなかった。

図3A-Cは対照培地(CM)又はセルトリー細胞前ならし培地(SCM)中で7日間にわたって単離、培養され、暗視野、干渉コントラスト光学装置で撮影された胎児ラットの腹側中脳(VM)からの細胞を示す光学顕微鏡写真であり、(A)は刺激又は分化の証拠を示さないCM中でインキュベートされたVM細胞を示し、(B)は高度に刺激されたことが明らかであるSCM中でインキュベートされたVM細胞を示し、又(C)はセルトリー分泌栄養因子の結果として神経突起外殖を示すSCM中でインキュベートされたVM細胞を高倍率で示す。

図4A-Bは侵入道（矢印）及びセルトリー細胞移植の部位を示す脳の線条(A)を示す電子顕微鏡写真であり、(B)は高倍率で高分解能で(A)中の箱形領域を示し、セルトリー細胞（矢印）が 1μ ラテックスビード封入体（これらは移植の前に細胞に入れられた）のために容易に同定される。

図5A-Bは脳の線条への移植の前に蛍光標識(Dil)でin situ 標識された移植されたセルトリー細胞を示す二つの光学顕微鏡写真であり、(A)はシクロスポリンA(CsA)による免疫抑制治療を受けなかったラット宿主中の生存蛍光セルトリー

細胞を示し、又(B)はシクロスポリンA免疫抑制治療を受けたラット宿主中の生存蛍光セルトーリ細胞を示す。

発明の詳細な説明

一般に、本発明は、一般に栄養因子と称されるセルトーリ細胞由来成長因子及び調節因子の*in situ* 産生を含むメカニズムにより機能障害組織の回復、保護、及び支持の促進方法を提供する。更に、本発明は*in situ* 栄養因子産生を生じる方法を提供する。これは単離されたセルトーリ細胞（その細胞は*in situ* で栄養因子を分泌する）を移植することにより行われる。

栄養因子を産生するための*in situ* ファクトリーとしてセルトーリ細胞を利用することの一つの重要な利点は、セルトーリ細胞が有効な免疫抑制効果を有することが示されたことである。それ故、免疫抑制を生じるための同時の付加的な療法は必要とされない。換言すれば、セルトーリ細胞は栄養因子源として使用し得るとともに、又、自己誘発局所免疫抑制効果を与える。

セルトーリ細胞により分泌される栄養因子として、セルトーリ細胞由来成長因子及び調節因子、例えば、インスリン様成長因子I及びII、上皮成長因子、形質転換成長因子 α 及び β 、並びにインターロイキン1 α (Griswold, 1992)が挙げられる。セルトーリ細胞分泌因子の更に広範囲のリストについて、表1を参照のこと。このような因子は神経変性疾患と関連する挙動上及び機能上の欠損に関して回復効果を有することが示された。これらの因子は、正常な細胞及び組織の代謝及び機能を支持する公知の栄養因子である (Griswold, 1992)。本発明は、セルトーリ細胞が細胞の機能障害又は細胞／組織の損傷の部位で栄養に富む、成長支持液体微小環境を生じることができるという現象を利用した。細胞／組織の損傷として、放射線損傷、やけど及び傷が挙げられるが、これらに限定されない。糖尿病モデルで使用されたセルトーリ細胞／膵島細胞移植プロトコルとは対照的に、本発明の方法は唯一の型の細胞、即ち、セルトーリ細胞を使用し、それにより二つの異なる細胞型を一つの宿主部位に移植しようと試みる際に固有の論理上及び操作上の問題をかなり減少する。

ラットセルトーリ細胞が下記の実施例に使用されるが、あらゆる好適な源から

のセルトリー細胞が使用し得る。例えば、ヒトセルトリー細胞がヒトにおける移植に使用し得る。更に、本発明の好ましい実施態様において、ブタセルトリー細胞がヒトの如き哺乳類に移植し得る。更に、本発明の獣医学的使用が意図されており、同系セルトリー細胞が所望の哺乳類宿主への移植に選ばれるであろう。

下記の実験部分に実証されるように、本発明はハンチントン病及びパーキンソン病の如き神経変性疾患と関連する挙動上及び機能上の欠損を回復するための治療として利用し得る。これはシクロスポリン A の慢性使用の如き従来利用された免疫抑制アジュバント療法の付随の副作用を生じないで行い得る。セルトリー細胞は栄養因子の分泌及び免疫抑制効果の両方を与える。

下記の実施例に示されるように、脳病変の誘発又は形成の前のセルトリー細胞の移植は神経保護効果を与えることができる。例えば、以下に実証されるように、ハンチントン型の疾患の誘発の前のセルトリー細胞の移植は、その後の脳病変に対し神経保護効果及び予防効果の両方を与えた。それ故、神経変性疾患の診断後の早期のセルトリー細胞の移植は、その疾患の有益な治療、予防又は減少を与え得る。更に、セルトリー細胞は頭部病変の如き CNS トラウマのその他の型の場合に移植されて CNS 損傷の効果を治療し、阻止し、予防的に減少し得る。

下記の実施例は、神経変性疾患と関連する挙動上の欠損を回復する本発明の能力を実証する。

実施例 1：セルトリー細胞移植

特別なプロトコル：

プロトコルは一般に二つの基本的な工程、(1)セルトリー細胞単離及び(2)細胞移植を伴い、その両方が以下に簡単に記載される（細胞単離に関する詳細について、Selawry 及びCameron(1993)、又、細胞移植に関する詳細について、Pak-zaban ら (1993)を参照のこと；その両方が参考として含まれる）。

(1A)セルトリー細胞単離

単離操作は良く記載された方法、Selawry 及びCameron(1993)に従い、ルーチンで利用される。全ての単離工程に使用され、細胞がインキュベートされた細胞培地は、レチノール、ITS、及びゲンタマイシンスルフェートを補給したDMEM:

Hams F12 (Cameron 及びMuffly, 1991) であった。辜丸を生後16日の雄のSDラットから手術により集めた。辜丸を被膜脱離し、酵素消化のために調製してセルトリー細胞からその他の辜丸細胞型を分離した。酵素操作は、多くの細胞分離プロトコルに使用される典型的な操作であり、コラゲナーゼ(0.1%)、ヒアルロニダーゼ(0.1%)、及びトリプシン(0.25 %)を使用した。連続酵素消化後に、セルトリー細胞単離物を培地で洗浄し、無菌培養容器に移し、保湿された、5 %CO₂-95 %空気の組織培養インキュベーターに入れた。39℃のインキュベーター中の48時間のプレインキュベーション後に、セルトリー細胞を洗浄して汚染デブリを除去した。得られるセルトリー細胞に富むフラクションをDMEM/F12培地0.25ml中で再度懸濁させ、少なくとも24時間にわたって37℃でインキュベートした。

次いでセルトリー細胞をトリプシンで容器の床から放出し、無菌の円錐試験管に移し、遠心分離により繰り返し洗浄し、トリプシンインヒビターで処理してトリプシンの酵素作用を停止した。移植の日の間に、セルトリー細胞に富むフラクションを再度懸濁させ、20ゲージのらせん針を有するハミルトンシリンジを使用して吸引した。

(1B) セルトリー細胞の単離及び前処理

又、既に記載されたように(Cameronら, 1987a; Cameronら, 1987b)、0.25%のトリプシン (シグマ) 及び0.1 %のコラゲナーゼ (シグマ、型V) (Cameronら, 1987a; Cameronら, 1987b)を使用して、被膜脱離されたラット辜丸を37℃で連続酵素処理にかけた。得られるセルトリー細胞凝集物を75cm²の組織培養フラスコ (コスター) 中の20mlの容積のインキュベーション培地中に均等に分配した。塗布されたセルトリー凝集物を48時間にわたって5 %CO₂-95%空気中で39℃でインキュベートし、その後、細胞を1分間にわたって無菌の0.5 mMのトリス-HCl 緩衝液による低張処理(Galdieri ら, 1981)にかけて汚染生殖細胞の除去を促進した。インキュベーション培地で2回洗浄した後、フラスコにインキュベーション培地20mlを再度補給し、5 %CO₂-95%空気中で37℃でCO₂噴射インキュベーターに戻した。得られる前処理されたセルトリーに富む単一培養物は95%より多いセルトリー細胞を含んでいた。塗布密度(<2.0 X 10⁶ セルトリー細胞/cm²)は細胞の集密単層をもたらさなかった。

(2) 細胞移植

移植プロトコルは既に記載された操作(Pakzaban ら, 1993)に従う。動物の手術を無菌条件下で行った。全ての動物を0.6 ml/kg のナトリウムペントバルビタールで初期麻酔し、次いでコフ(Kopf)定位手術装置に入れた。前後方向=+1.2、中外側=+/-2.8、背腹=6.0、5.9、及び5.8 (Paxinos及びWatson, 1984の環椎を基準とする) にセットした座標を使用して、一側性線条体移植を行った。病変した黒質に同側性の線条にセルトーリ細胞を移植した。夫々の線条は全容積 3 μ L のセルトーリ細胞懸濁液を受ける。セルトーリ細胞懸濁液 1 マイクロリットルを背腹部位に対し 1 分間にわたって注入した。対照は培地のみを受けた。針を引っ込める前に最後の背腹部位に達した後、更に 5 分間経過させた。手術後、動物を加熱パッドの上に置いて回復させた。手術直後及び移植後のに、シクロスポリン A (20 mg/kg/d, i.p.) を使用して、動物が短い経過の免疫抑制を受ける。しかしながら、その後の研究は、この短い経過のシクロスポリン A が必要とされないことを実証した (図 5A-B)。

セルトーリ細胞を、パーキンソン病の例に示されるように、特定の疾患について規定された定位手術座標により種々の神経変性疾患の動物モデルに移植し、次いでその動物モデルに特別の技術により機能回復について系統的に評価する。

本研究は 6-OHDA 誘発ヘミパーキンソン症の生後 8 週の雄の SD ラット (n=12) を使用した。病変後 3 週で、動物を、アポモルヒネ誘発回転挙動及び揺動挙動を含む挙動試験にかけた。基準線データは全てのこれらの動物で有意なアポモルヒネ誘発回転挙動 (CNS の病変側に反対側) を示した (30 分間で少なくとも 200 回転)。上昇された生体揺動試験 (EBST) を使用して、有意な右バイアスされた揺動活動 (70% より大きい) が又観察された。

病変後 3 週で、動物の一つのグループ (n=6) はセルトーリ細胞を受け、一つのグループ (n=6) を同じ手術操作にかけたが、対照として培地のみ (血清を含まない DMEM) を受けた。全ての動物は移植の最初の 2 日後にシクロスポリン (20 mg/kg) を受けた。移植後 1 ケ月、1.5 ケ月、及び 2 ケ月で、動物を同挙動試験に再度導入した。

セルトーリ細胞を受けている動物は回転の有意な減少 (30 分間で平均 50 回転)

を示し、一方、培地単独を受けている動物は移植前の回転レベルであった（図1）。回転挙動の正常化は2ヶ月の試験期間にわたって持続した。セルトーリ細胞移植動物により既に示された右バイアスされた揺動活動が又移植後の試験期間で有意に減少された（図2）。培地を受けている動物はそれらの右バイアスされた揺動応答で有意な減少を示さなかった。

検死で、脳を動物から除去し、40–80 μm でビブラトム(vibratome)切開のために固定した。染色後に、セルトーリ細胞が移植されなかった病変動物中の侵入部位と比較した時、セルトーリ細胞移植ラット中の侵入部位（即ち、病変部位）で活性化されたグリア細胞の著しい減少があった。

実施例2：神経細胞の成長

インキュベーション培地及びセルトーリ細胞前ならし培地

セルトーリ細胞培養及び同時培養に使用したインキュベーション培地は、3 mg/mlのL-グルタミン(シグマ、銘柄III)、0.01cc/ml のインスリントランスフェリン-セレン(ITS、コラボラチブ・リサーチ社)、50 ng/mlのレチノール(シグマ)、19 μl /mlの乳酸(シグマ)及び0.01cc/ml のゲンタマイシンスルフェート(ギブコ)を補給した、1:1 で混合されたダルベッコ最小必須培地:Hams F12 栄養培地(ウイットテーカー・バイオプロダクツ)であった。

単離したセルトーリ細胞の最初の48時間のインキュベーション後に、培地を回収し、5分間にわたって1500rpm で遠心分離した。上澄みを回収し、直ちに無菌試験管中で凍結した。この培地をセルトーリ前ならし培地(SCM)と同定した。

胎児脳細胞の単離及びインキュベーション

胎児脳細胞(FBC)を胎児ラット(15–17日の妊娠)の腹側中脳から回収した。胎児脳組織を培地中に懸濁させ、それを一連の連続的に減少するサイズの皮下注射針(18–26 ゲージ)に通すことにより最初に分散させた。得られる懸濁液を5分間にわたって0.1 %のトリプシンで処理し、続いて2分間にわたって0.1 %のトリプシンインヒビターで処理した。懸濁したFBC を3回洗浄し、インキュベーション培地中で再度懸濁させ、ポリ-L-リシン被覆培養容器に塗布した。

胎児ラットの腹側中脳(VM)からの細胞を単離し、図3Aに示されたように、対照

培地 (CM) 又はセルトリー細胞前ならし培地 (SCM) 中で7日間にわたって培養した。CM中でインキュベートしたVM細胞は細胞の刺激又は分化の証拠を示さなかった。図3Bを参照して、SCM中でインキュベートしたVM細胞は高度に刺激された。図3Cは、高倍率で、SCM中でインキュベートしたVM細胞がセルトリー細胞分散栄養因子に対する応答として神経突起外殖を示すことを示す。

実施例3：セルトリー細胞の同定

ラテックスビーズの混入：

セルトリー細胞を単離し、記載されたようにしてインキュベーションのために調製した。移植の前（約12時間）、無菌の1 μ mのラテックスビーズ（10 μ g/mlの培地、ペルコ、タスチン、CA）をインキュベーション培地に添加した。セルトリー細胞はビーズを迅速に貪食した。移植の直前に、ビーズ処理されたセルトリー細胞を洗浄（3回）し、インキュベーション培地1ml中で再度懸濁させた。

図4Aを参照して、セルトリー細胞を脳の線条に移植し、その図に侵入道（矢印）及びセルトリー細胞移植の部位が示される。図4Bに示されたような高倍率で、セルトリー細胞（矢印）を、移植の前にセルトリー細胞に装填された1 μ のラテックスビーズの混入のために容易に同定した。

実施例4：移植したセルトリー細胞の生存に関するシクロスポリンA (CSA)の効果

蛍光細胞標識：

移植の直前（約2時間）に、セルトリー細胞単一培養物を細胞トラッキング（100 μ lの原液/ml培地；モレキュラー・プローブズ社（オイゲン、OR））のために37℃で7分間にわたってCM-DiI蛍光色素で処理し、次いで更に15分間にわたって4℃で置いた。蛍光“標識された”セルトリー細胞を洗浄（3回）、インキュベーション培地1ml中で再度懸濁させた。

in situ で移植されたセルトリー細胞の生存に関するシクロスポリンAの効果を調べた。移植されるセルトリー細胞を脳の線条への移植の前に蛍光標識（DiI）で標識した。その組織を移植後1ヶ月で回収した。図5Aを参照して、生存蛍光セ

ルトリー細胞が、シクロスポリンAによる免疫抑制治療を受けなかったラット宿

主中で見られた。図5Bを参照して、生存蛍光セルトリー細胞が、シクロスポリンA免疫抑制治療を受けなかったラット宿主中に示される。この実施例は、シクロスポリンAが脳に移植されたセルトリー細胞の生存に必要ではないことを実証する。

実施例5：セルトリー細胞の予防効果

セルトリー細胞の移植は、脳病変を誘発する前に移植された時に神経保護性である。セルトリー細胞のこの予防効果をハンチントン病(HD)の動物モデルで実証した。このモデルはミトコンドリアインヒビター、3-ニトロプロパロン酸(3NP)の全身投与により生じられる。3NPの注射がハンチントン病に見られる病変を模擬する線条中の特別な病変を生じることが、Sanberg 及び同僚(Koutouzisら, 1994; Borlongan ら, 1995) 並びにその他により実証されていた。

本実験において、8匹のラットに正常なラットの一つの線条に一侧にラットセルトリー細胞(前記のとおり)を移植した。それ故、脳的一侧はセルトリー細胞を有し、別の側は有していなかった。1ヶ月後に、動物にいずれかに記載されたようにして(Koutouzisら, 1994; Borlongan ら, 1995)3NPを注射してHDを誘発した。3NPを注射された時の正常なラットは脳の前脚の左右の損傷を示し、生体の両側で等しい挙動上の欠損を有する(Koutouzisら, 1994; Borlongan ら, 1995)。

3NP投与の1ヶ月後に、動物は一侧の挙動上の欠損を示した。これは、対照ではなく、セルトリー移植動物中の病変後のアポモルヒネ誘発回転の実証により見られた(回転の数; 対照=0.25 ± 0.6; セルトリー移植=197 ± 31.9, $p < 0.0001$)。この非対称の回転挙動は、セルトリー細胞を移植されなかった脳の側部の病変を示した。それ故、セルトリー細胞移植体は、栄養メカニズムに関して、その後の脳病変に対し神経保護効果及び予防効果を有する。これは、有意な損傷が存在する前に、セルトリー移植が神経変性疾患を早期に治療するのに又有益であり得るという証拠を与える。

これらの結果は、一緒にされると、セルトリー細胞がパーキンソン病及びハンチントン病の動物モデルの挙動上及び機能上の欠損を回復することを示す。関係

するメカニズムはおそらく実施例2に示されたような神経組織の成長により実証されるようなセルトリー細胞由来成長因子、及び関連する神経組織の回復及び延長された支持を促進する調節因子の分泌である。更に、セルトリー細胞は病変部位でグリア細胞活性化を抑制することにより脳中で神経組織を保護し、神経組織回復を促進し得る。又、これらの結果は移植されたセルトリー細胞の*in situ*の生存を実証する。

この出願中で、種々の刊行物が引用又は番号により参照される。刊行物に関する十分な引用が以下にリストされる。本発明が関係する技術水準を更に十分に記載するために、これらの刊行物のそのままの開示がこの出願への参照により本明細書に含まれる。

本発明が例示の様式で記載され、使用される用語は限定ではなく、説明の性質であることが意図されることが理解されるべきである。

明らかに、本発明の多くの改良及び変化が上記教示に鑑みて可能である。それ故、請求の範囲内で、本発明は明記された以外に実施し得ることが理解されるべきである。

表1

I. セルトリー細胞由来成長因子及び調節因子（部分的なリスト）

カテゴリー及びタンパク質	機能
ホルモン／成長因子	
ミューラー抑制物質は	ミューラー管を抑制する
インヒビンは	FSH 放出を抑制する
インスリン様成長因子 （ソマトメジンA及びC、IGF）	成長因子
プロジノルフィン	
インターロイキン-1 α	マイトジェン
形質転換成長因子 α & β	成長因子
塩基性繊維芽細胞成長因子	成長因子
LHRH様因子	ライディヒ細胞ステロイド産生

(未精製又は不完全に特性決定)

セルトリー分泌成長因子

成長因子

輸精成長因子

ライディヒ細胞刺激活性

テストチン

CMB タンパク質

ビタミン結合タンパク質

ビタミン輸送

輸送及び生物保護

トランスフェリン

鉄輸送

セルロプラズム

銅輸送

サポシンは

グリコスフィンゴリピドを結合する

SGP-2(クルステリン)

脂質輸送?

アンドロゲン結合タンパク質は

T及びDHT を輸送する

SPARC

カルシウム結合タンパク質?

IGF 結合タンパク質

IGF 輸送

リボフラビン結合タンパク質

リボフラビン輸送

プロテアーゼ及びプロテアーゼインヒビター

プラスミノーゲンアクチベーター

プロテアーゼ

環状タンパク質-2

プロテアーゼインヒビター

シスタチン

プロテアーゼインヒビター

α_2 -マクログロブリン

プロテアーゼインヒビター

型IVコラゲナーゼ

プロテアーゼ

メタロプロテイナーゼ

プロテアーゼ

基底膜

コラーゲンIV

ラミニン

プロテオグリカン

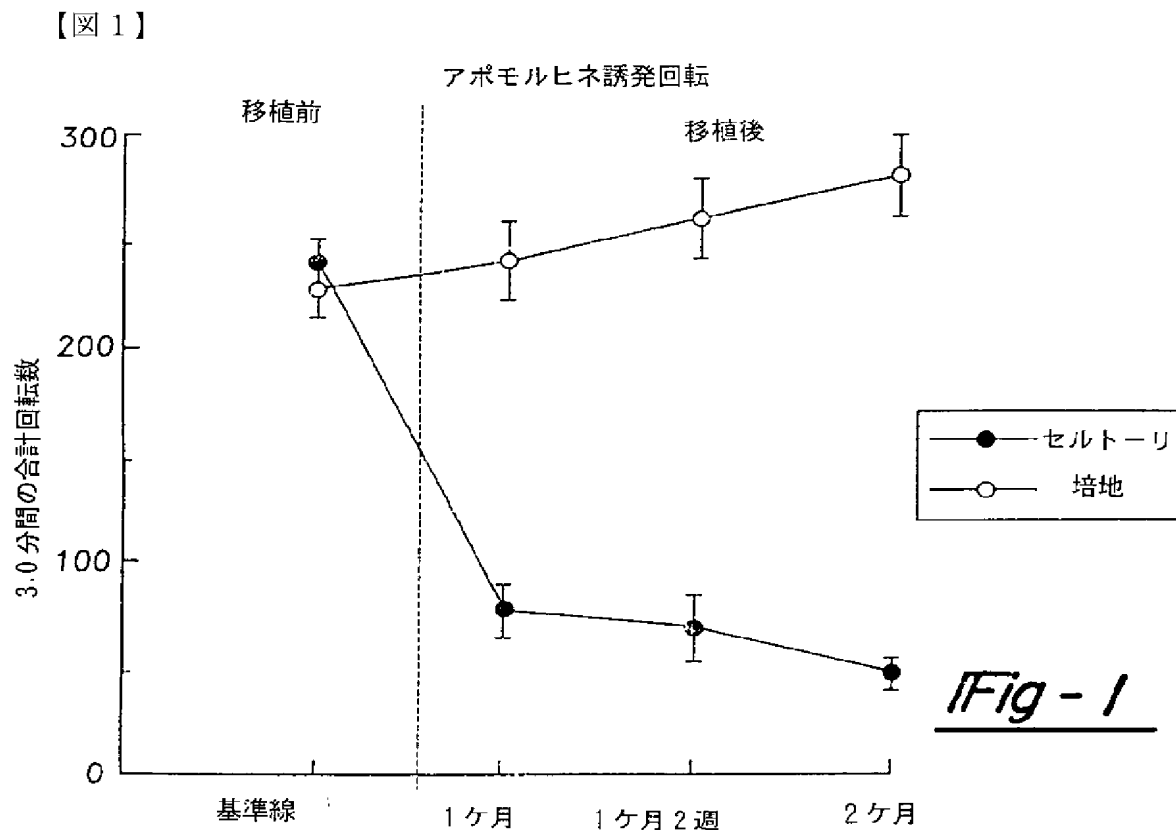
REFERENCES CITED

- Bjorklund and Stenevi, "Intracerebral neural grafting: a historical perspective" in Bjorklund, A and U. Stenevi, eds. Neural grafting in the mammalian CNS, Amsterdam: Elsevier, 3-11 (1985).
- Bjorklund, "Dopaminergic transplants in experimental Parkinsonism: Cellular mechanisms of graft-induced functional recovery" Current Biology, 2:683-689 (1992).
- Borlongan et al., "PR: Systemic 3-nitropropionic acid: Behavior deficits and striatal damage in rats" Brain Research Bulletin, 36:549-556 (1995).
- Cameron et al., "Successful islet/abdominal testis transplantation does not require Leydig cells" Transplantation, 50:549-556 (1995).
- Cameron and Muffly, "Hormonal regulation of spermatid binding to Sertoli cells in vitro." J. Cell Sci., 100:523-533 (1991).
- Griswold, "Protein Secretion by Sertoli cells: general considerations" in Russell, L.D. and M.D. Griswold eds. The Sertoli Cell, Cache River Press, Clearwater, FL, 195-200 (1992).
- Isacson et al., "Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington's disease" Proc. Natl. Acad. Sci., 83:2728-2732 (1986).
- Koutouzis et al., "PR: Systemic 3-nitropropionic acid: Long term effects on locomotor behavior" Brain Research, 646:242-246 (1994).
- Lindvall et al., "Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen" Ann. Neurol. 22:457-468 (1987).
- Lindvall et al., "Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease" Science, 247:574-577 (1990).
- Pakzaban et al., "Increased proportion of Ache-rich zones and improved morphological integration in host striatum of fetal grafts derived from the lateral but not the medial ganglionic eminence" Exp. Brain Res., 97:13-22 (1993).

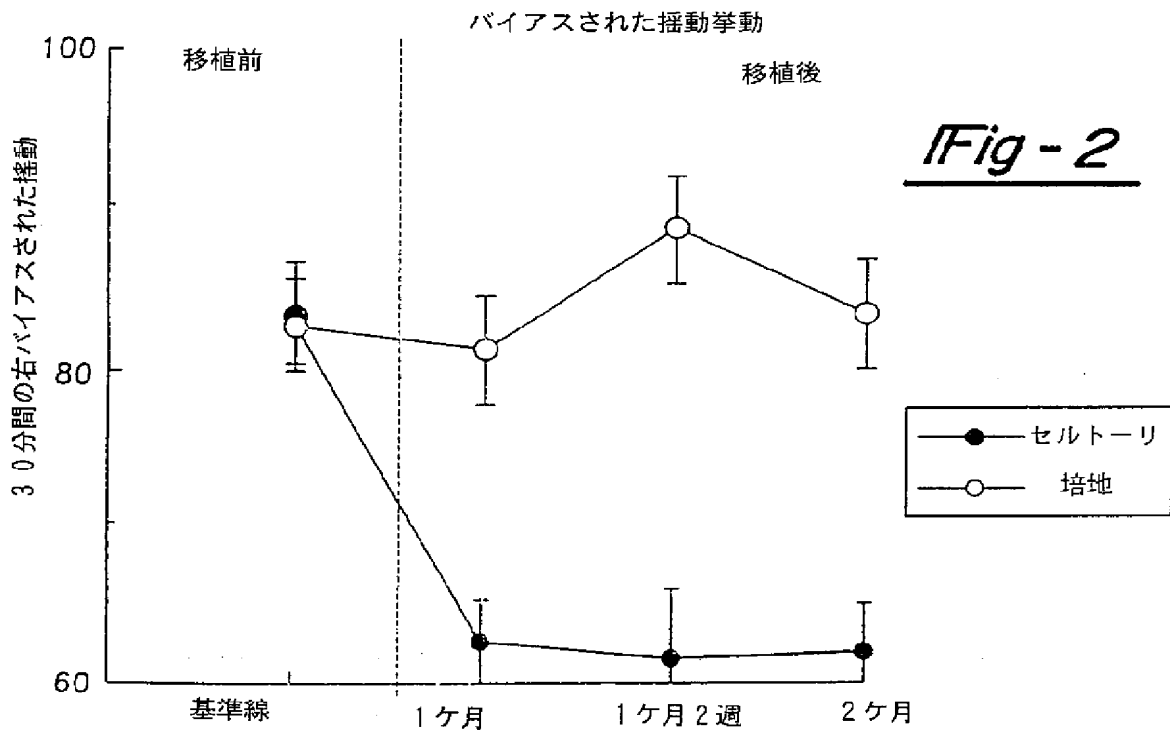
Sanberg et al., "Cell transplantation for Huntington's disease" R.G. Landes Co., Boca Raton, FL, pp.19-21 (1994).

Selawry and Cameron, "Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation" Cell Transplan., 2:123-129 (1993).

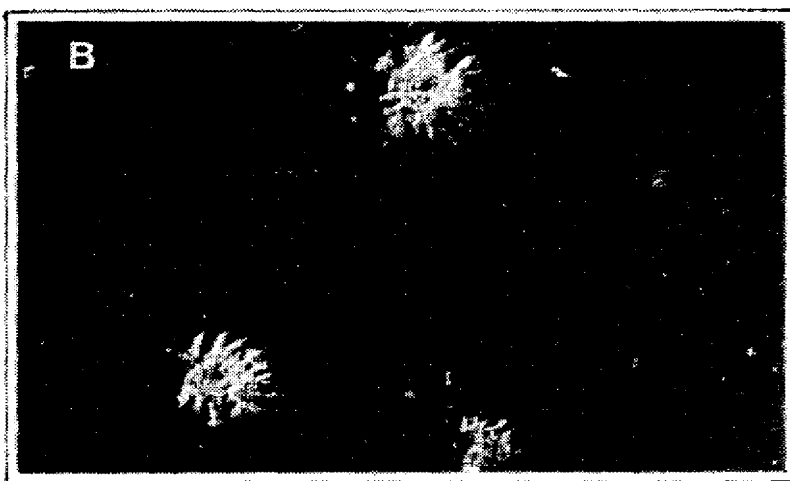
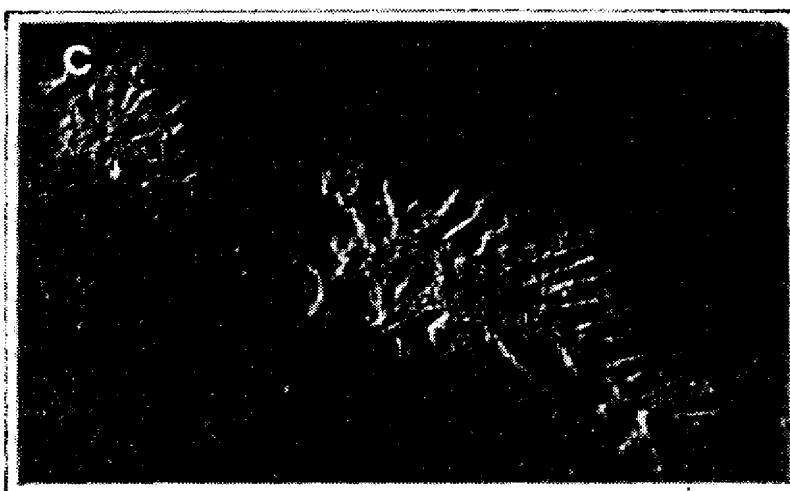
Victorin et al., "Reformation of long axon pathways in adult rat CNS by human forebrain neuroblasts" Nature, 347:556-558 (1990).



【図2】



【図3】

Fig - 3AFig - 3BFig - 3C

【図4】

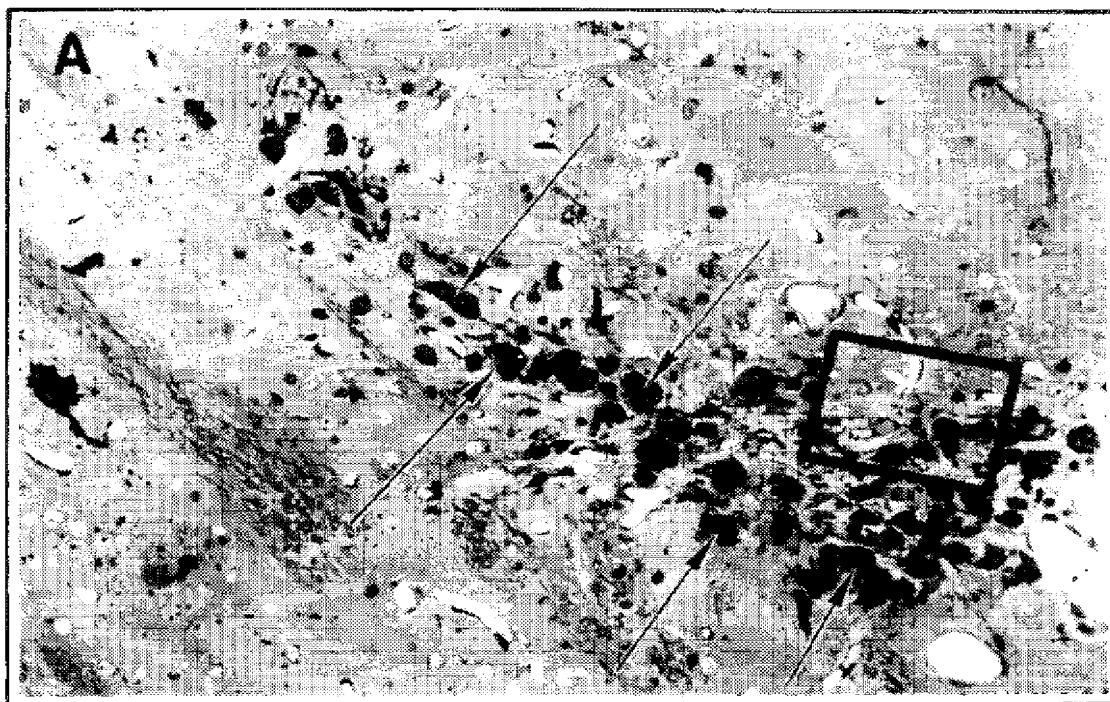
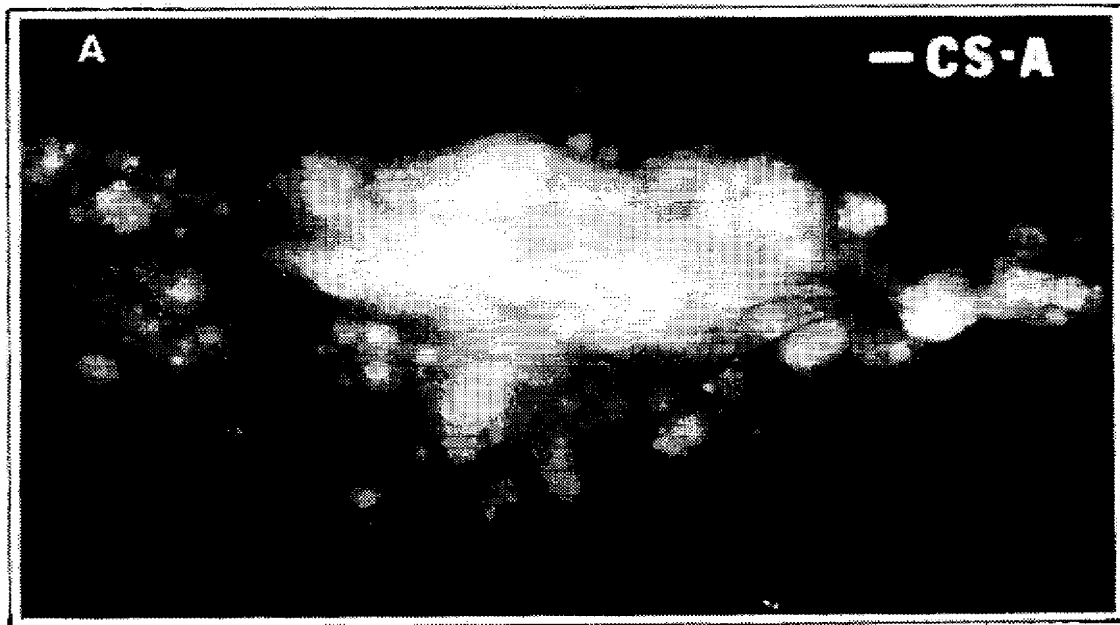
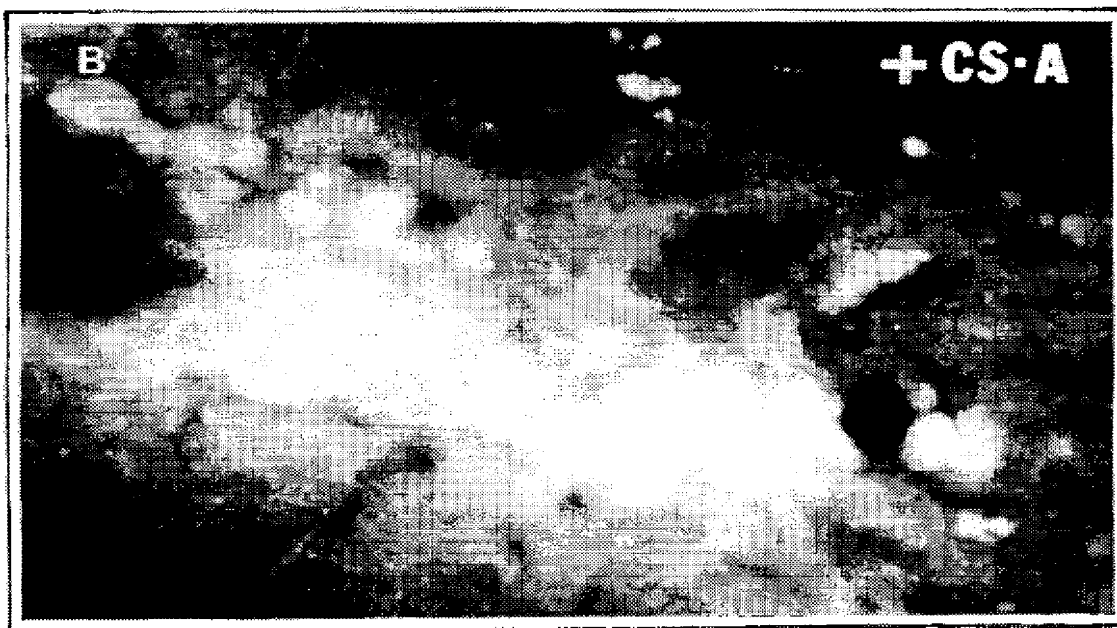


Fig - 4A



Fig - 4B

【図5】

Fig - 5AFig - 5B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/03335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(5) : A01N 63/00; C12N 5/00 US CL : 424/93.7; 435/240.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.7; 435/240.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, Chemical Abstracts, Biosis		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Lindvall et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's Disease. Science. 02 February 1990, Vol. 247, pages 574-577, especially pages 575-576.	1-17
X	Cameron et al. Hormonal regulation of spermatid binding. Journal of Cell Science. 1991, Vol. 100, pages 623-633, especially page 632.	1-17
X	Carson et al. Synthesis and secretion of a novel binding protein for retinol by a cell line derived from Sertoli Cells. Journal of Biological Chemistry, 10 March 1984, Vol. 259, pages 3117-3123, especially pages 3122-3123.	18-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 JUNE 1996		Date of mailing of the international search report 27 JUN 1996
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Deborah Crouch</i> DEBORAH CROUCH, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN

(72)発明者 カメロン ドン エフ
アメリカ合衆国 フロリダ州 33549 ル
ッツ クリアー レイク ドライヴ
18206

(72)発明者 ボーロンガン セサリオ ヴィ
アメリカ合衆国 フロリダ州 33549 ル
ッツ ジェイムズタウン 17802エイ

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成15年8月12日(2003.8.12)

【公表番号】特表平11-501818

【公表日】平成11年2月16日(1999.2.16)

【年通号数】

【出願番号】特願平8-527777

【国際特許分類第7版】

C12N 5/06

A61K 35/48 AAB

【F I】

C12N 5/00 E

A61K 35/48 AAB

手 続 補 正 書

請求の範囲

平成 15 年 3 月 12 日

特許庁長官 太 田 信一郎 殿

1. 事件の表示 平成8年特許願第527777号

2. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 ユニヴァーシティ オブ ナウス フロリダ

3. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号

電話(代) 3211-8741

氏 名 (5995) 弁護士 中 村 稔



4. 補正命令の日付 自 発

5. (本補正により請求の範囲に記載された請求項の数は合計「18」となりました。)

6. 補正対象書類名 明細書

7. 補正対象項目名 請求の範囲

8. 補正の内容 別紙記載の通り

1. 神経疾患又は神経変性疾患を治療するための移植用医薬組成物であって、セルトーリ細胞及び医薬的に許容しうる担体からなり、該セルトーリ細胞が *in situ* で免疫抑制効果及び栄養効果を生じることを特徴とする医薬組成物。
2. 前記移植がセルトーリ細胞及び中枢神経系と同型の移植組織を中枢神経系へ同時移植することとして更に定義される、請求項1に記載の医薬組成物。
3. 前記セルトーリ細胞が神経細胞と共に哺乳類の中枢神経系へ同時移植される、請求項2に記載の医薬組成物。
4. 前記セルトーリ細胞と同時移植される神経細胞が、最初にセルトーリ細胞と同時培養され、次いで同時培養した細胞と一緒に同時移植する、請求項3に記載の医薬組成物。
5. 前記移植がセルトーリ細胞を中枢神経系へ直接注入することとして更に定義される、請求項1に記載の医薬組成物。
6. 前記セルトーリ細胞がブタセルトーリ細胞である、請求項1に記載の医薬組成物。
7. 前記哺乳類が、痲痺、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病及び脳の情動障害を含む神経疾患又は神経変性疾患を患っている、請求項3に記載の医薬組成物。
8. 痲痺、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、筋ジストロフィー、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病及び脳の情動障害を含む神経疾患を治療するための移植用医薬組成物であって、セルトーリ細胞及び医薬的に許容しうる担体からなり、該セルトーリ細胞が *in situ* で免疫抑制効果及び栄養効果を生じることを特徴とする医薬組成物。
9. 治療対象がヒトである、請求項8に記載の医薬組成物。
10. 前記セルトーリ細胞がブタセルトーリ細胞である、請求項3に記載の医薬組成物。

組成物。

11. 前記移植が変性疾患から中枢神経系を保護することとして更に定義される、請求項3に記載の医薬組成物。

12. 前記移植が損傷した中枢神経系組織を回復することとして更に定義される、請求項3に記載の医薬組成物。

13. 前記神経疾患又は神経変性疾患が、癱瘓、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病及び脳の情動障害を含んでいる、請求項3に記載の医薬組成物。

14. in situで栄養因子産生を生じさせる方法であって、

セルトーリ細胞を人体を除く対象の組織損傷領域へ移植する工程を含み、

該セルトーリ細胞が in situで栄養因子を分泌することを特徴とする方法。

15. 癱瘓、卒中、ハンチントン病、頭部外傷、脊髄外傷、痛み、パーキンソン病、ミエリン欠乏、神経筋疾患、神経痛、筋萎縮性側索硬化、アルツハイマー病及び脳の情動障害を含む神経疾患を治療するためにブタセルトーリ細胞を治療対象の中枢神経系へ移植することにより in situで栄養因子産生を生じさせるのに有用なセルトーリ細胞であって、

該セルトーリ細胞が in situで栄養因子を分泌することを特徴とする細胞。

16. 治療対象がヒトである、請求項15に記載のセルトーリ細胞。

17. セルトーリ細胞を対象の組織損傷領域へ移植することにより in situで栄養因子産生を生じさせるのに有用なセルトーリ細胞であって、

該セルトーリ細胞が in situで栄養因子を分泌することを特徴とする細胞。

18. 神経変性疾患を含む神経疾患により引き起こされる行動欠陥及び機能欠陥を改善させるための医薬組成物であって、

セルトーリ細胞及び医薬的に許容しうる担体からなり、

該セルトーリ細胞は中枢神経系へ移植されることにより in situで栄養因子を産生することを特徴とする医薬組成物。